



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102015004780-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102015004780-0

(22) Data do Depósito: 04/03/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 06/09/2016

(51) Classificação Internacional: C07K 7/08; C07K 14/35; G01N 33/569; G01N 33/68; A61K 39/04; A61P 31/08.

(54) Título: SEQUÊNCIA PEPTÍDICA MIMÉTICA DE ANTÍGENO DE MYCOBACTERIUM LEPRAE COM MAIOR ANTIGENICIDADE SE ADSORVIDA A SUPERFÍCIE METÁLICA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua João Negrão, 280 2º andar, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200

(72) Inventor: MARIÂNGELA BORGES RIBEIRO DA SILVA; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA; RILTON ALVES DE FREITAS; JULIANA FERREIRA DE MOURA; VANETE THOMAZ SOCCOL; GUILHERME FADEL PICHETH; SILVANA MARIA ALLBAN; JULIANA FERREIRA DE SANTANA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/03/2015, observadas as condições legais

Expedida em: 18/05/2021

Assinado digitalmente por:
Adriana Briggs de Aguiar

Diretora Substituta de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Sequência peptídica mimética de antígeno de *Mycobacterium leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica

[001] A presente invenção trata-se de um produto caracterizado por ser uma sequência aminoacídica modificada a partir de um peptídeo mimético de *Mycobacterium leprae* (Alban *et al.*, 2011 - PI015110000997, Alban *et al.*, 2013, 2014) que, após sintetizado quimicamente com a inclusão de uma sequência de serina e glicina e, ainda, uma cisteína na porção C-terminal apresentou capacidade de ser adsorvido a superfície metálica e, ainda, de ser melhor exposto a ligantes como, por exemplo, anticorpos produzidos contra o bacilo. Essas características tornaram o peptídeo modificado mais antigênico quando comparado à sequência peptídica original.

[002] O *M. leprae* é um bacilo causador de uma doença crônica, granulomatosa, denominada de Hanseníase que afeta pele, sistema nervoso periférico e, ocasionalmente, outros órgãos e sistemas (Becheli e Curban, 1988). A principal forma de transmissão é por vias aéreas superiores (Jopling e Dougall, 1991; Ministério da Saúde - BRASIL, 1994). A identificação do *M. leprae* pode ser feita através do método direto em que a bactéria é identificada pela sua forma e coloração (baciloscopia) além de métodos indiretos pela presença de anticorpos como por exemplo, imunoglobulina M (IgM) contra o glicolípido fenólico I (PGL-I) (Spencer *et al.*, 2011).

[003] Atualmente, antígenos recombinantes ou semisintéticos (Spencer *et al.*, 2012) e também miméticos e sintéticos (Alban *et al.*, 2013; 2014) tem sido avaliados quanto à antigenicidade, ou seja, capacidade de se ligar a produtos do sistema imunológicos tais como anticorpos. Nesse contexto, o produto aqui descrito trata-se de uma sequência aminoacídica modificada a partir de um peptídeo mimético

de proteínas de *Mycobacterium leprae* (Alban *et al.*, 2011 - PI015110000997, 2013, 2014) com a inserção de uma sequência de resíduos de serina e glicina e ainda uma cisteína na porção C-terminal. Essas alterações permitiram a adsorção do peptídeo à uma superfície metálica e ainda uma maior antigenicidade frente a anticorpos específicos produzidos contra o bacilo *M. leprae*. Essas modificações fizeram com que houvesse uma sensibilidade e uma especificidade de 100% nos testes realizados.

[004] Há uma grande dificuldade em se encontrar antígenos que sejam reconhecidos por anticorpos produzidos contra o *M. leprae*, uma delas reside no fato do bacilo não ser cultivável em laboratório mas somente recuperado de órgãos de tatus infectados. Por isso, o desenvolvimento de antígenos recombinantes, sintéticos e/ou semisintéticos com sensibilidade e especificidade passou a ter grande importância.

[005] Aliado ao fato do *M. leprae* desencadear em alguns pacientes a resposta imunológica celular com baixa concentração de anticorpos, a utilização de estratégias de adsorção de antígenos sintéticos miméticos a partículas metálicas, como aqui descritos, acoplados a uma balança de cristal de quartzo proporcionou o aumento da antigenicidade em termos de sensibilidade e especificidade.

[006] Em trabalhos anteriores, peptídeos miméticos de *M. leprae* foram selecionados e utilizados como antígenos na identificação de soros positivos e exclusão de negativos utilizando-se a técnica de ELISA (Alban *et al.*, 2014). O termo mimético refere-se a uma sequência aminoacídica selecionado por técnicas biotecnológicas que simula ou imita propriedades estruturais, funcionais e/ou imunológicas de uma determinada molécula encontrada na natureza (Deroo e Muller, 2001).

[007] O produto aqui descrito, portanto, trata-se de um peptídeo modificado a partir da sequência descrita por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e 2014 que imita ou simula as propriedades estruturais de um peptídeo presente em proteína(s) do *Mycobacterium leprae* e portanto, faz com que anticorpos produzidos contra o bacilo reconheçam o peptídeo mimético (Alban *et al.*, 2013; 2014). A antigenicidade desse peptídeo aqui descrito foi aumentada quando resíduos de serina e glicina foram adicionados e ainda quando houve a inserção de uma cisteína na porção C-terminal, fator importante na adsorção sobre superfície metálica.

[008] São muitos os estudos científicos que se referem à produção de antígenos que possuem afinidade por anticorpos anti proteínas de *M. lepra*. Porém, esses antígenos diferem quanto ao peptídeo descrito aqui em termos de constituição, massa molecular e/ou composição aminoacídica.

- Artigos científicos, revisões e teses que relatam antígenos sejam eles peptídeos, proteínas recombinantes, antígenos brutos utilizados na detecção de anticorpos produzidos contra o *M. leprae*, agente causador da hanseníase, porém com constituição, origem, especificidade e propriedades bioquímicas diferentes do peptídeo descrito no presente documento.

[009] Spencer, J.S. *et al.* Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clin.Vaccine Immunol.**18(2):260, 2010.

[010] Oftung, F. *et al.* Human T cell recognition of the *Mycobacterium leprae* LSR antigen: epitopes and HLA restriction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 24, 151-159, 1999.

[011] Oliveira, J.D.D. **Identificação e caracterização de peptídeos miméticos dos antígenos de *Mycobacterium leprae* por phage display.** Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

[012] Sampaio, L.H. *et al.* Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infectious Diseases**, 11-26, 2011.

[013] Spencer, J.S. *et al.* Identification of serological biomarkers of infection disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 107(Suppl. I): 79-89, 2012.

[014] Moura, R.S. *et al.* Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(Suplemento II):11-18, 2008.

[015] Silva, R.C. *et al.* The result patterns of ML Flow and ELISA (PGL-I) serologic tests in leprosy-endemic and non-endemic areas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(Suplemento II):19-22, 2008.

[016] Bobosha, K. *et al.* Peptides derived from *Mycobacterium leprae* ML160c discriminate between leprosy patients and healthy endemic controls. **Journal of Tropical Medicine**, 1-11,2012.

[017] Spencer, J. S. and Brennan, P. J.The Role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev**, 82, 344–357, 2011.

[018] Geluk, A. *et al.* Postgenomic Approach to Identify Novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve

immunodiagnosis of infection. **Infection and Immunity**, p. 5636–5644 Vol. 73, No. 9, 2005.

[019] Geluk, A. *et al.* Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev**, 82, 402–421, 2011.

[020] Youn, J. H. *et al.* Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Immunology and Medical Microbiology**, 41, 51-57, 2004.

[021] Geluk, A. *et al.* Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, 15 (3): 522, 2008.

[022] Alban, S. M. *et al.* Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **Infec.Dis.** 25, 13-42, 2013.

[023] Alban, S.M; de Moura, J.F.; Minozzo, J.C.; Mira, M.T.; Thomaz Soccol, V. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infect.** 2013. Dis 13: 42.

[024] Alban, S.M.; de Moura, J., Thomaz Soccol V. (2011) Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacinas. Brazilian Patent PI015110000997

- Artigos científicos e revisões que reportam a utilização de antígenos adsorvidos sobre superfície metálica mas que diferem do descrito nesse documento quanto a constituição, origem, especificidade e propriedades bioquímicas.

[025] Sul, T. *et al.* An acetylcholinesterase antibody-based quartz crystal microbalance for the rapid identification of spinal ventral and dorsal roots. **Plos One**. Vol 8, 7, 1-6, 2013.

[026] Guo, X. *et al.* A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, 38, 177-183, 2012.

[027] Park, I. S.; Kim, W. Y.; Kim, N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. **Biosensors and Bioelectronics**, 15, 167-172, 2000.

[028] Shang, Y. *et al.* Immobilization of a Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Mimotope-Derived Synthetic Peptide on Au and Its Potential Application for Detection of Herceptin in Human Serum by Quartz Crystal Microbalance. **Analytical Chemistry**, 8928-8936, 2011.

[029] Tang, Dian-Quan. *et al.* Amplification of the antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back – filling immobilization of nanogold on bio recognition surface. **Journal of Immunological Methods**, 316, 144-152, 2006.

[030] Sadhasivam, S. A. *et al.* Real detection of the ovarian tumor associated antigen 1 (OVTA 1) in human serum by quartz crystal microbalance immobilized with anti OVTA 1 polyclonal chicken IgY antibodies. **Materials Science and Engineering C**, 32, 2073-2078, 2011.

- **Artigos científicos e revisões que reportam a inserção do linker GSGS em peptídeos de forma a torná-los mais acessíveis a ligantes. Porém, esses peptídeos são distintos do descrito nesse documento no**

que se refere à constituição, origem, especificidade e propriedades bioquímicas.

[031] Shang, Y. *et al.* Immobilization of a human epidermal growth factor receptor 2 mimotope-derived synthetic peptide on au and its potential application for detection of herceptin in human serum by quartz crystal microbalance. **Analytical Chemistry**, 8928-8936, 2011.

[032] Robinson-Mosher, A. *et al.* Dynamics simulation for engineering macromolecular interactions. **Chaos**. 23 (2), 2013.

[033] Shen, Z. *et al.* Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Anal.Chem.** 80 (6), 1910-1917, 2008.

- Artigos científicos e revisões que reportam a adsorção de peptídeos a partículas metálicas. Porém, esses peptídeos são distintos do descrito nesse documento no que se refere à constituição, origem, especificidade e propriedades bioquímicas.

[034] Shang, Y. *et al.* Immobilization of a Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Mimotope-Derived Synthetic Peptide on Au and Its Potential Application for Detection of Herceptin in Human Serum by Quartz Crystal Microbalance. **Anal.Chem.**, 8928-8936, 2011.

[035] Wu, J. *et al.* Development of a Troponin I Biosensor using a peptide obtain through Phage Display. **Anal.Chem.**, 82, 8235-8243, 2010.

[036] Ohtsuka, K. *et al.* Immobilization of sunflower trypsin inhibition (SFTI-1) peptide onto a gold surface and analysis of its interaction with trypsin. **Analyst.**, 129 (10), 888-889, 2004.

[037] Donatan, S. *et al.* Effect of solid surface charge on the binding behaviour of a metal-binding peptide. **J R Soc Interface**, 9 (75), 2688–2695, 2012.

[038] Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um produto caracterizado por ser um peptídeo antigênico sintético mimético de *M. leprae*, ou seja, capaz de ser reconhecido por anticorpos anti bacilo que foi modificado em sua porção C-terminal de forma a se obter 100% de especificidade e 100% de sensibilidade quando adsorvido em superfície metálica. Isto se deve ao fato desse produto possuir características tais como resíduos de serina e glicina (SGSG) na porção C-terminal além de uma cisteína (C) C-terminal distal que faz com que o peptídeo, uma vez sintetizado quimicamente, possa ser adsorvido sobre superfície metálica e, conseqüentemente, mais exposto ao ligante.

[039] A sensibilidade desse peptídeo modificado foi verificada quando reagiu com quantidades muito pequenas de anticorpos anti *M. leprae* não detectáveis quando utilizadas outras superfícies sólidas tais quais o poliestireno (Figura 1) por técnicas como o ELISA. A especificidade desse peptídeo sintético foi confirmada pela não reatividade frente aos controles negativos. Porém, ainda pelo ensaio imunoenzimático, em algumas análises não houve 100% de especificidade pois houve reconhecimento de anticorpos feitos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo semelhante ao *M. leprae* (Figura 2).

[040] Para contornar esse problema de forma a aumentar a especificidade e manter a sensibilidade, o peptídeo modificado descrito aqui foi adsorvido a uma superfície metálica e a reatividade antígeno-anticorpo avaliada por uma microbalança de cristal de quartzo (QCM) (Figura 3). A adsorção à superfície metálica foi confirmada por microscopia de força atômica (AFM) (Figura 4) e pela

análise do ângulo de contato avaliado em cada uma das etapas do ensaio (Tabela 1).

Descrição da Invenção

[041] Tendo em vista a necessidade de se potencializar a antigenicidade de um peptídeo mimético de *M. leprae* com a sequência **APDDPAWQNI~~FN~~LR** descrita por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e 2014, à sequência aminoacídica original foi adicionada uma sequência de serinas e glicinas (SGSG), além de uma cisteína na porção C-terminal que fez com que o peptídeo fosse mais exposto aos ligantes, no caso, anticorpos e ainda que fosse adsorvido a uma superfície metálica.

[042] Para tanto a sequência peptídica **APDDPAWQNI~~FN~~LRSGSGC** Foi sintetizada com no mínimo de 85 % de pureza, testada quanto a capacidade de ser adsorvida sobre superfície metálica e ainda quanto à antigenicidade frente a anticorpos produzidos contra o bacilo causador da hanseníase, o *M. leprae*.

Descrição detalhada da Invenção

[043] A sequência amininoacídica **APDDPAWQNI~~FN~~LRSGSGC**, é um produto caracterizado por ser um peptídeo mimético de *M. leprae* modificado a partir da sequência **APDDPAWQNI~~FN~~LR** descrito por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e 2014 que, após síntese química, foi adsorvido sobre uma superfície metálica. Essa adaptação é caracterizada pela inserção de serinas e glicinas (SGSG) além de uma cisteína (C) C-terminal distal que fez com que o peptídeo sintético fosse adsorvido sobre superfície metálica e adicionalmente o tornou mais exposto a ligantes.

[044] A adsorção do material à superfície metálica foi verificada por microscopia de força atômica e confirmada pela análise do ângulo de contato enquanto que a sensibilidade e especificidade do antígeno ao anticorpo pode ser evidenciado pela balança de cristal de quartzo conforme metodologia descrita abaixo:

Análise da antigenicidade (ELISA)

[045] Placas de microtitulação com 96 poços (Nunc - Becton Dickinson) foram sensibilizadas com peptídeo em concentração de 10 µg/mL em tampão bicarbonato de sódio (0,05 M, pH 9,6) e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (tampão de bloqueio livre de proteínas - Thermo Fisher Scientific) por 1 hora a 37°C, as placas foram incubadas com os soros diluídos (1:50) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti humano IgG Fc-específico ligado a biotina (Sigma-Aldrich) diluído 1:2500 em tampão de incubação foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, foi adicionada estreptavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) em diluição 1:10.000 e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, o substrato (peróxido de hidrogênio e cromógeno ortofenilenodiamina – OPD Sigma-Aldrich) foi adicionado. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos foram determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicata e os resultados expressos como a média dos ensaios.

[046] Adsorção do peptídeo em superfície metálica – utilização da microbalança de cristal de quartzo (QCM)

[047] Limpeza do sensor: preparou-se a solução piranha (3 partes de H_2SO_4 a 98,08%vol 1 parte de H_2O_2 a 34,01 %vol) onde o sensor de metal foi mergulhado por 15 minutos. Realizaram-se 2 lavagens em álcool 99,5%vol P.A. por 5 minutos e posteriormente em água destilada. O sensor metálico foi seco em fluxo de N_2 a 2 Psi de pressão e deixado em contato com luz UV durante 15 min.

[048] Adsorção do peptídeo ao sensor de metal: preparou-se a solução de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptídeo diluído em água. Adicionaram-se 200 μL da solução de peptídeo sobre o sensor de forma que cobrisse a superfície metálica por 16 horas a 4 °C em câmara úmida.

[049] Bloqueio do sensor metálico: após lavagem em água destilada, uma solução de 1% de BSA foi adicionada e incubada por 1 hora a 37 °C. Após lavagem, o sensor foi seco em N_2 a 2 Psi de pressão.

[050] Verificação da antigenicidade do peptídeo através da QCM: o sensor foi colocado na câmara de fluxo do equipamento em fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Adicionaram-se aproximadamente 250 μL da amostra de anticorpo diluído 1:50. O comportamento do sensor foi avaliado e após estabilização, adicionou-se água para lavar o sistema.

[051] Microscopia de força atômica (FAM) para avaliação de rugosidade da superfície do sensor. A morfologia superficial dos filmes de nanocompósitos foi investigada por MFA em equipamento Agilent 5500 em modo dinâmico utilizando pontas de silício Mikromasch ultrasharp NSC14 com constante de mola nominal de 5,7 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

[052] Tensiometria para determinação do ângulo de contato (θ). Medidas de ângulo de contato da água sobre os filmes foram feitas a 25 °C em tensiômetro OCA 15+ (Dataphysics). Ângulos de contato de avanço foram obtidos pelo método da gota sésil. Foram realizadas 3 medidas para cada composição.

[053] Análise estatística. As análises estatística foram realizadas utilizando-se o software Origin lab 7,0. Testes de Anova One Way seguido de Teste Tukey foram usados com nível de significância inferior a 0,05.

Legenda das figuras

[054] FIGURA 1. Comparação, por ELISA, da antigenicidade do peptídeo mimético 1C descrito por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e em 2014 (A) e do peptídeo modificado pela adição da sequência de serina e glicina (SGSG) e de uma cisteína na porção C-terminal (B) descrito nesse documento. Com o peptídeo modificado houve diminuição do ponto de corte e como consequência, a identificação de um número maior de soros contendo anticorpos específicos, ou seja, aumentou-se a antigenicidade do peptídeo e sua sensibilidade. Nota: CN = controle negativo, PA = soros positivos com alto título de anticorpos, PM = soros positivos com título mediano de anticorpos, PB = soros positivos com título baixo de anticorpos.

[055] FIGURA 2. Avaliação, por ELISA, da especificidade do peptídeo modificado a partir da sequência descrita por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e 2014 pela adição de uma sequência de serina e glicina (SGSG) e de uma cisteína na região C-terminal, frente a anticorpos produzidos contra o *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo semelhante ao *M. leprae*. Pelo teste imunoenzimático, houve certa reatividade inespecífica do peptídeo modificado com anticorpos anti *M. tuberculosis*, ou seja, por ELISA, a especificidade não alcançou 100%, mas 96%.

[056] FIGURA 3. Comparação das diferentes interações do peptídeo, modificado a partir da sequência descrita por Alban e colaboradores em 2011 (PI015110000097) e 2014, e as respectivas

amostras. Em (A) utilizaram-se amostras de soro de voluntários sadios, em (B) amostras de pacientes com tuberculose e em (C) amostras de pacientes hansênicos. As interações podem ser visualizadas pela diferença de frequência observada na plataforma da microbalança de cristal de quartzo (QCM). Quanto maior a diferença de frequência, maior é a deposição deste material sobre a balança demonstrando que houve uma maior interação da molécula utilizado como amostra (anticorpo) e do composto (peptídeo) adsorvido à superfície metálica do sensor. Pode-se notar que houve maior interação entre peptídeo e anticorpo quando a amostra de pacientes hansênicos foi avaliada. Através deste experimento, utilizando-se a QCM, demonstrou-se uma especificidade e sensibilidade de 100%, ou seja, superior à utilização do método de ELISA.

[057] FIGURA 4. Imagem topográfica de fase obtida pela microscopia de força atômica (AFM). Aspecto rugoso típico da superfície metálica sem adsorção de material (A). Imagem em alta resolução do sensor metálico cuja adsorção do peptídeo, modificado a partir da sequência descrita por Alban e colaboradores em 2011 (PI0151100000997) e 2014 pela adição de uma sequência de serina e glicina (SGSG) e de uma cisteína na região C-terminal, em sua superfície a torna mais uniforme (B).

[058] Tabela 1. Descreve a diferença significativa do ângulo de contato na superfície do sensor metálico nas diferentes fases (sem adsorção, adsorção do peptídeo e adsorção do peptídeo ligado ao anticorpo) de deposição do material sobre a superfície metálica.

TABELA 1: MÉDIA \pm ERRO PADRÃO PARA MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO REALIZADAS A PARTIR DA TÉCNICA DE TENSIOMETRIA. Todos os grupos diferem significativamente entre si.

	Superfície metálica sem adsorção	Superfície metálica + peptídeo adsorvido	Superfície metálica + peptídeo adsorvido + anticorpo
Ângulo de Contato (θ)	81,6 \pm 0,6 ^a	63,1 \pm 1,0 ^b	46,3 \pm 1,8 ^c

Nota: Letras minúsculas desiguais (^a, ^b e ^c) significam que todos os grupos de análise diferem significativamente entre si.

Referências

[059] Alban SM, de Moura JF, Minozzo JC, Mira MT, Soccol VT. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infect Dis.** 25;13:42, 2013

[060] Alban SM, de Moura JF, Thomaz-Soccol V, Bühner Sékula S, Alvarenga LM, Mira MT, Olortegui CC, Minozzo JC. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS One.** 29;9(8):e106222, 2014

[061] Alban S, de Moura J, Thomaz-Soccol, V. Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacinas. Privilégio de Inovação. Número do registro: PI0151100000997, data de depósito: 03/05/2011, Instituição de registro: INPI, 2011

[062] Bechelli LM, Curban GV. Infecções microbianas da pele. **In: Compêndio de dermatologia**, 6^o ed, Atheneu Editora, São Paulo, p. 131-186, 1988

[063] Deroo S and Mulle CP. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopes as substitute antigens: applications and limitations.

Comb Chem High Throughput Screen. 4 (1):75-110, 2001

[064] Jopling WH, Mc Dougall AC. A doença. **In: Manual de hanseníase**, 4º ed, Atheneu Editora, São Paulo, p. 11-59, 1991.

[065] MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Guia de controle da hanseníase**. 2o ed., MS/FNS/CENEPI/CNDS, Brasília, 156 p., 1994

[066] Spencer, J. S. and Brennan, P. J. The Role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev.** 82, 344–357, 2011

[067] Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Jackson M, Li W, Kurihara JN, Maghanoy A, Mallari I, Saunderson P, Brennan PJ, Dockrell HM. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 107 Suppl 1:79-89, 2012



Cumprimento de exigência

Número do Processo: BR 10 2015 004780 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 75095679000149

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua João Negrão, 280 2o andar

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 80010-200

País: Brasil

Telefone: (41) 3360 7441

Fax: (41) 3360 7416

Email: coord.pi@ufpr.br

Referência Petição

Pedido : BR102015004780-0

FIGURAS

Figura 1

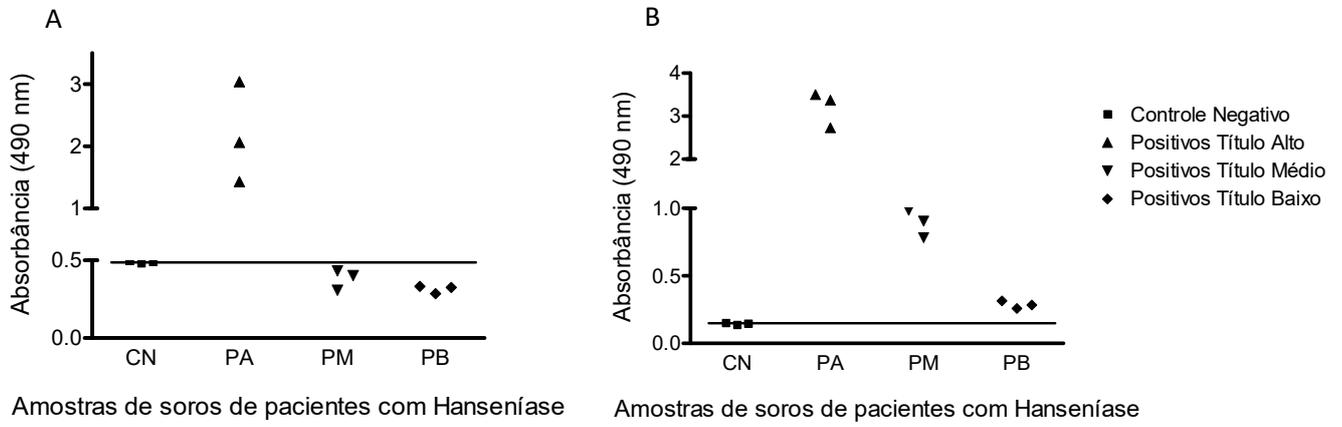


Figura 3

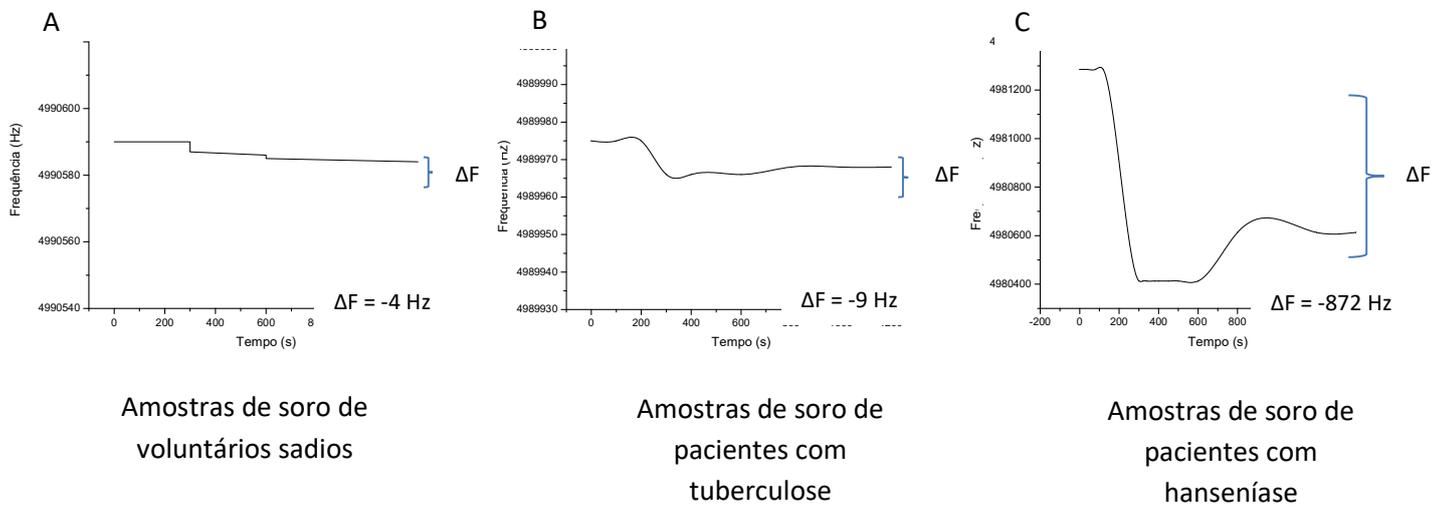


Figura 4

